

장염비브리오가 보유하는 β -lactamase (VPA0477)의 유전학적 특성

이남형 · 송현정 · 박창수¹ · 김희대² · 박권삼*

군산대학교 식품생명공학과, ¹대구카톨릭대학교 식품생명공학과

²충북도립대학 바이오생명의학과

Genetic Characterization of β -lactamase (VPA0477) in *Vibrio parahaemolyticus*

Nam-Hyung Lee, Hyun-Jung Song, Chang-Soo Park¹, Hee-Dai Kim² and Kwon-Sam Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Hayang 712-702, Korea

²Department of Biotechnology and Biomedicine, Chungbuk Provincial College, Okcheon 373-807, Korea

Using 108 strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater, we investigated ampicillin-resistance profiles and the genetic characterization of β -lactamase (VPA0477). All of the strains studied, except one strain, were resistant to ampicillin. However, the strain that was susceptible to ampicillin had the same β -lactamase gene as the ampicillin-resistant strains. We compared β -lactamase promoter region sequences among five strains, including both ampicillin-resistant and -susceptible strains. In the susceptible strain, a nucleotide at position -19 in the methionine initiation codon for β -lactamase was not present in the ampicillin-resistant strains. The genes in the region containing the gene VPA0477 were present in all of the tested strains, and LA-PCR analysis showed that the distance between VPA0474 and VPA0479 in all of the *V. parahaemolyticus* samples was precisely 5.7 kb. In *V. parahaemolyticus* β -lactamase, four important structural features that are conserved in Class A β -lactamases were present in the deduced amino acid sequences. Taken together, our study demonstrates that *V. parahaemolyticus* β -lactamase is included in the Class A β -lactamase group, and some nucleotides within the promoter region are of particular importance for β -lactamase activity.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*, β -lactamase, VPA0477 gene, Ampicillin

서 론

장염비브리오는 해수 및 기수지역에 분포하고 있는 저도 호염성 해양세균으로 이 균에 오염된 어패류를 생식하거나 불충분하게 가열 처리된 수산물을 섭취하였을 때 급성위장염 증상을 나타내는 식중독 원인세균이다(Sakazaki et al., 1968; Honda and Iida, 1993). 장염비브리오는 수온이 17°C 이상으로 상승하는 하절기에는 자유 유영의 형태로 해수에서 쉽게 검출되나 수온이 10°C 이하로 낮아지면 해수에서의 검출빈도는 급격히 떨어지며 수온이 낮은 동절기에는 해저의 저질에서 동물성 플랑크톤의 키틴질 등에 부착하여 월동한다고 보고되어 있다(Kaneko and Colwell, 1975). 우리나라에서 장염비브리오에 의한 식중독 사고는 수온이 상승한 여름철에 집중적으로 발생하며 매년 전체 세균성 식중독 사고의 약 20% 전후를 차지하고 있는 실정이다. 해수 및 어패류 등의 자연계에서 분리한 장염비브리오의 대부분은 비병원성이나 식중독 환자의 가검물에서 분리된 장염

비브리오의 대부분은 병원성이다(Sakazaki et al., 1968; Honda and Iida, 1993). 이 균이 생산하는 대표적인 병원성 독소는 내열성용혈독(thermostable direct hemolysin, TDH), 내열성용혈독 관련용혈독(TDH-related hemolysin, TRH), serine protease 및 type III secretion systems (TTSS 1 또는 2)를 통해 분비되는 각종 effector 단백질 등이 보고되어 있으나 정확한 병원성 메커니즘에 관한 설명은 아직도 많이 부족한 실정이다(Honda and Iida, 1993; Lee et al., 2002; Makino et al., 2003; Park et al., 2004; Kodama et al., 2007; Kodama et al., 2008).

페니실린 발견 이후 다양한 종류의 항생제는 사람과 동물의 치료, 질병예방 및 성장촉진 등의 목적으로 사용되고 있다. 어류 양식장의 경우, 양식어의 질병예방 및 치료를 위하여 항생제를 사료에 첨가하거나 약욕 방식으로 소기의 목적을 달성하고 있다. 수산용으로 사용된 전체 항생제의 사용량은 2005년 275톤을 정점으로 서서히 감소추세이나 2008년 한해 사용량은 194톤으로 아직도 항생제 사용량은 적지 않다. 최근 수산용 항생제 판매실적은 oxytetracycline, erythromycin, amoxicillin, 설파계열, ciprofloxacin, ampicillin순이다(NVRQS, 2009). 지속적인

*Corresponding author: parkks@kunsan.ac.kr

Table 1. Primers used in this study

Target gene	Oligonucleotide sequence	Amplicon size (bp)	Reference
VPA0465	5'-AAAGCAAGGATCCCTATGAC-3' 5'-TCITTCAAAATCGCTGGTGT-3'	254	This study
VPA0470	5'-TTGGCAACAAGATCGATTTA-3' 5'-TTCACCTCTGTAGTTCAACGT-3'	356	This study
VPA0474	5'-TAAAAATGCGTGCATTAGAA-3' 5'-AGAAAGAGTAATCCAATGCG-3'	321	This study
VPA0479	5'-TATGCCTGCGAATGGGGCGA-3' 5'-TGGAATGTTACAAGCAAAC-3'	322	This study
VPA0484	5'-ACGAAAACGAATGAACAAGA-3' 5'-ATCATGCCGGAGCCATCAAC-3'	302	This study
VPA0486	5'-ATTGTGTTCACTTACGTTAT-3' 5'-ACGTTGGCCACCATGATAAT-3'	321	This study
VPA0477 promoter	5'-TTTAGTTTTTCTAGCGTAATG-3' 5'-TAACTAACAGTTGAGCAAAC-3'	263	This study
VPA0477	5'-AAAGAACGAAGAACCACGC-3' 5'-CTTGGTTGCTCGAGTTGAGC-3'	894	This study
VPA0474 ~ VPA0479	5'-AGAAAGAGTAATCCAATGCG-3' 5'-TATGCCTGCGAATGGGGCGA-3'	5,744	This study

고 다량의 항생제 사용으로 인한 양식어류에서의 항생제 내성균은 증가 추세이다(Son et al., 2003; Son et al., 2005; Lee et al., 2007; Oh et al., 2008; Lee et al., 2009; Yu et al., 2010). Trimethoprim에 내성을 나타내는 장염비브리오는 class I integron 내에 존재하는 *dhfrA27* 유전자에 의해 trimethoprim에 내성을 나타내며, class I integron 내에는 gentamicin과 rifampin의 내성에 관여하는 유전자도 포함되어 있다는 연구결과가 최근에 보고되었다(Yu et al., 2010).

β -lactamase(EC 3.5.2.6)는 penicillins, cephamycins, carbapenems 등과 같은 β -lactam계 항생제의 β -lactam ring을 개열함으로써 항균성을 상실시키는 가수분해효소로 1940년에 처음으로 대장균에서 발견된 이래 오늘날에는 광범위한 세균에서 그 생산이 알려져 있다. β -lactamase는 아미노산 배열에 의해 Class A, B, C, D 4종류로 분류하고 있다(Massova and Mobashery, 1998). Class B는 활성중심에 Zn^{2+} 이 있는 metallo-enzyme이지만, Class A, C와 D는 활성부위에 세린 잔기를 갖고 있는 효소이다(Massova and Mobashery, 1998). β -lactam계 항생물질은 가축 질병의 치료 및 성장촉진을 위한 사료 첨가제로 많이 사용되고 있다. β -lactam계 항생물질 중 ampicillin은 양식 어류의 유결절증, 비브리오증, 연쇄상구균증 및 에드워드병의 예방 및 치료에, 그리고 amoxicillin은 양식 어류의 그람 양성균, 그람 음성균, 유결절증 및 절창병 등의 예방 및 치료에 광범위하게 사용되고 있다(Lambert and O'Grady, 1992). Genome sequence가 완료된 장염비브리오 RIMD2210633 균주에서 ampicillin 분해유전자인 β -lactamase와 상동성이 있는 유전자(VPA0477)는 작은 염색체에 존재한다고 보고되어 있지만 그 유전자에 대한 해석은 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 해수분리 장염비브리오의 ampicillin 내성 profile 및 최소발육억제농도(minimum inhibi-

Table 2. Ampicillin-resistance and minimum inhibitory concentration (MIC) of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater

MIC to ampicillin (μ g/mL)	Ratio (%)
2,048	22/108(20.4)
1,024	65/108(60.2)
512	19/108(17.6)
128	1/108(0.9)
<2	1/108(0.9)

tory concentration, MIC)를 검토하였으며, 아울러 균에 따라 ampicillin에 대한 MIC가 다른 이유를 β -lactamase (VPA0477)의 유전학적 해석을 통해 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

실험에 사용한 균주는 2008년부터 2010년에 전북 곰소만의 표층 해수에서 분리한 장염비브리오 108개 균주 및 참고 균주는 genome sequence가 완료된 장염비브리오 RIMD2210633 (Makino et al., 2003)를 사용하였다. 유전자 조작에는 실험실에 보관중인 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다. 유전자 조작에 사용한 각종 효소류는 Takara (Japan)사의 제품을 사용하였으며, plasmid DNA 정제는 Qiagen (USA)사의 QIAprep Spin Miniprep Kit를 사용하였다. Ampicillin, carbenicillin, cefotaxime, cephalothin, oxacillin 및 penicillin-G 등의 항생제는 Sigma (USA)사의 제품을 사용하였다.

DNA 증폭용 primer set

실험에 사용한 DNA 증폭용 primers는 Table 1에 나타내었다. Genome sequence가 완료된 장염비브리오 RIMD2210633 균주의 해당 유전자 염기서열을 참조하여 Bioneer (Daejeon, Korea)에 의뢰 합성하였다.

최소발육억제 농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정

MIC는 미국 NCCLS (National Committee for Laboratory Standards, 2002)법에 기초하여 변법으로 측정하였다. 멸균된 Muller-Hinton broth (Merck, Germany)에 농도를 달리한 ampicillin을 첨가한 후 멸균된 소형시험관에 배지를 2 mL씩 분주하였다. 여기에 식염이 3% 첨가된 Luria-Bertani (LB) broth에서 전배양한 시험균주 5 μ L을 접종하여 35°C에서 18시간 정치 배양후 균 증식여부는 육안으로 확인하였다.

VPA0477 유전자 및 프로모터 영역의 클로닝 및 염기서열 결정

Table 1에 나타낸 primers 및 각 균주의 정제된 염색체 DNA

Table 3. Minimum inhibitory concentrations(MIC, $\mu\text{g/mL}$) of β -lactams of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater

Strain	Ampicillin	Carbenicillin	Cefotaxime	Cephalothin	Oxacillin	Penicillin-G
Strain 3	2,048	2,048	<2	4	64	2,048
Strain 10	1,024	2,048	<2	4	64	2,048
Strain 41	512	1,024	<2	4	64	1,024
Strain 61	126	512	<2	4	64	512
Strain 17	<2	16	<2	4	32	8
Strain 8	2,048	2,048	<2	4	64	2,048
Strain 8 Δ VPA0477	<2	2	<2	4	32	<2
RIMD2210633	1,024	1,024	<2	4	64	1,024

Table 4. Distribution of the genes in the up- and down-stream containing the VPA0477 gene in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater

Strain	VPA0453	VPA0470	VPA0474	VPA0477	VPA0479	VPA0484	VPA0486
Strain 3	+	+	+	+	+	+	+
Strain 10	+	+	+	+	+	+	+
Strain 41	+	+	+	+	+	+	+
Strain 61	+	+	+	+	+	+	+
Strain 17	+	+	+	+	+	+	+
Strain 8	+	+	+	+	+	+	+
RIMD2210633	+	+	+	+	+	+	+

를 주형으로 95°C에서 3분간 열 변성한 후 95°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분을 30회 반복하여 DNA를 증폭하였다. 증폭산물은 pT7Blue T-vector에 TA cloning하였으며, 염기서열은 error 방지를 위하여 3개의 clone를 사용하여 양쪽 방향으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열의 alignment는 CLUSTAL W 프로그램을 사용하였으며, 상동성 검색은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)를 통하여 실시하였다.

Long accurate PCR (LA-PCR)

VPA0477 유전자를 포함한 약 5.7 kb의 DNA 증폭은 LA-PCR Kit (version 2; Takara Shuzo, Japan)를 사용하였으며 LA-PCR 반응은 95°C에서 3분간 열 변성한 후 98°C 20초, 58°C 30초, 68°C 7분을 30회 반복한 다음 마지막으로 72°C에서 10분 1회 신장하였다. 증폭된 DNA 산물은 0.8% agarose gel에서 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하였다.

결과 및 고찰

해수분리 장염비브리오의 ampicillin내성 및 MIC 측정

2008년부터 2010년까지 전라북도 부안군 곰소만의 표층해수에서 분리한 장염비브리오 108개 균주에 대한 ampicillin내성 및 최소발육억제농도(MIC)를 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험에 사용한 108개 균주 중 ampicillin에 감수성을 나타낸 균주는 1개 균주(0.9%)이며, 나머지 107개 균주(99.1%)는 최소발육억제농도의 차이는 있지만 ampicillin에 내성을 나타내었다. Table 2에 나타낸 바와 같이 2,048 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타

내는 균주는 22개 균주(20.4%)이며, 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타내는 균주는 65개 균주로 전체의 60.2%를 차지하였다. 512 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타내는 균주는 19개 균주(17.4%)였다. 256 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타내는 균주는 없었으며, 1개 균주(0.9%)는 128 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 나타내었다. 또한 128 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 MIC를 나타내는 균주는 존재하지 않았다. 1,024 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 고도내성을 나타내는 균주는 전체 108개 균주 중 87개 균주(80.6%)로 매우 높은 비율을 차지하고 있었다. 이 결과는 양식어류 및 해수 분리 장염비브리오는 일반적으로 ampicillin에 고도내성을 나타내고 있다는 기존의 보고와 거의 유사한 결과이다(Son et al., 2003; Lee et al., 2007; Lee et al., 2009; Lee and Park, 2010). 최근 장염비브리오의 ampicillin 내성에 관련하는 유전자는 이 균의 작은 염색체에 존재하는 VPA0477로 밝혀졌다(Lee and Park, 2010). 따라서 108개 균주에 대한 VPA0477 유전자 유무를 dot blot hybridization 및 PCR assay로 확인한 결과 실험에 사용한 108개 모든 균주에서 양성으로 확인되었다(data not shown). 놀랍게도 ampicillin 감수성 균주에서도 VPA0477 유전자가 존재한다는 점은 매우 의외의 결과이며, VPA0477 유전자를 보유하고 있으면서도 ampicillin에 감수성을 나타내는 이유는 VPA0477 유전자의 변이에 의한 전사 또는 번역과정의 문제로 인해 β -lactamase의 발현이 전혀 불가능하거나 불충분하여 ampicillin에 감수성을 나타낸다고 판단된다.

β -lactam계 항생제에 대한 MIC

분자 내에 β -lactam 환(ring)을 가진 항생물질을 총칭하여 β -lactam계 항생물질이라 한다. β -lactam계 항생물질에는 6개의

VP	<u>MKKLFLLVGL</u>	<u>MVCSTVSYAS</u>	KLNEDISLIE	KQTSGRIGVS	VWDTQTDKRW	DYRGDERFPL
VE	<u>MKKLFLLAGL</u>	<u>MVCSTLSYSS</u>	QLNEDISLIE	QQTSSRIGVS	VWDTQTDERW	DYRGDERFPL
VH	<u>MKKLFLLLGL</u>	<u>LACSSATYAA</u>	KLNEDISAIE	EHISGRIGVS	VWNTQTDDHW	DYRGDERFPM
VF	<u>MKIKPFLFGL</u>	<u>IVLANNAIAG</u>	SLTQNIIEAIE	LSSGGYIGVS	VLNTETNKTW	AYKGDQRFPM
VP	MSTFKTLACA	TMLSMDMSGK	LKNKATAKID	ERNIVVWS PV	MDKLAGQSTR	IEHACEAAML
VE	MSTFKTLACA	TMLSMDMSGK	LSKNATAKID	ERSIVVWS PV	MDKLAGQSTR	VEHACEAAML
VH	MSTFKTLACA	TMLSMDNEK	LDKNATAKVE	ERNMVVWS PV	MDRMAGQTTR	IEHACEATML
VF	MSTFKTLACA	KMLYDSSVGG	IDKYKTT SIT	KEQIMPWS PV	TEPLIGNMIT	TQKACEATML
VP	MSDN TAANLV	LNEIGGPKAV	TQFLRSIGDK	ATRLDRLEPR	LNEAKPGDKR	DTTTPNAMVN
VE	MSDN TAANLV	LNEIGGPKAV	TMFLRSIGDK	ATRLDRLEPR	LNEATPGDNR	DTTTPNAMVN
VH	MSDN TAANIV	LRSIGGPRGV	TFFLRSVGDK	ATRLDRFEPR	LNEANPGDKR	DTTTPNAMVN
VF	MSDN TAANIV	LNEIGGPPSL	TQFLRAMGDT	KTRLDRIEPE	LNEBKNGDKR	DTTTPVAMSQ
VP	TLHTLMEDNA	LSYESRTQLK	IWMQDNKVS	SIMRSVLPKG	WSIADRSGAG	NYGSRGISAM
VE	TLRTLIEGET	LSYESRVQLK	IWMQDNKVS	SIMRSVLPKG	WSIADRSGAG	GHGSRGINAI
VH	TLHTLLEGDA	LSYESRIQLK	IWMQDNKVS	SIMRSVLPKG	WSIADRSGAG	GFGSRGITAM
VF	TLNALLFGNT	LNSQDEQTLK	SWMMNNKVS	ELLRSILPND	WSIADRSGAG	GFGSRGITAA
VP	IWKDNYKPVY	ISIIYVTDL	SLQARDQLIA	QISQLILEHY	KES	
VE	IWKENHRPVY	ISIIYVTTEL	SLQARDQLIA	QISQLILQKY	KDN	
VH	IWKENHKPIY	ISIIYITETDL	SLQARDQIIA	QVSQLILDEY	NTI	
VF	IWNDKHQPII	ISIIYLTQTKL	DMAERNQVIV	EVGNAIFKEF	KIN	

Fig. 1. Amino acid sequence alignment of the β-lactamases of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio* sp. *Ex25*, *V. harveyi* and *V. fisheri*. Conserved amino acid regions important for catalytic function of β-lactamases are boxed. A 19-aa signal peptide is indicated by underlined and italic style. VP, *V. parahaemolyticus*; VE, *Vibrio* sp. *Ex25*; VH, *V. harveyi*; VF, *V. fisheri*.

기본골격 즉, penam, cephem, carhapenem, oxapenam, penem 및 monobactam 골격으로 나뉜다. β-lactam계 항생물질의 항균메커니즘에 관한 연구는 penicillin을 중심으로 밝혀져 있는데, 세균의 세포벽 합성에 관여하는 효소계(transglycosidase, transpeptidase, carboxypeptidase, endopeptidase 등)에 특이적으로 작용 함으로서 항균효과를 나타낸다고 보고되어 있다 (Highton and Hobbs, 1971; Tomasz and Waks, 1975). Table 2에 나타낸 바와 같이 장염비브리오는 β-lactam계 항생물질의 한 종류인 ampicillin에 다양한 MIC를 나타내고 있기 때문에 다른 종류의 β-lactam계 항생물질에 대한 MIC를 검토하였다(Table 3). 사용한 β-lactam계 항생물질에는 carbenicillin, cefotaxime, cephalothin, oxacillin 및 penicillin-G 등 5종을 사용하였으며, 균주는 ampicillin에 각각 다른 MIC를 나타내는 일부 선별된 장염비브리오 및 VPA0477 결손균주(Lee and Park, 2010)를 사용하였다. 그 결과 실험에 사용한 8개 모든 균주는 cefotaxime 및 cephalothin에 <2 μg/mL 및 4 μg/mL의 MIC를 나타내어 야생형, VPA0477 결손균주 및 ampicillin 감수성 균주(strain 17)간의 차이는 전혀 없었다. 또한 oxacillin에 대한 야생형의 MIC는 64 μg/mL인 반면 VPA0477 결손균주 및 ampicillin 감수성 균주의 MIC는 32 μg/mL으로 나타났으나 큰 차이는 없다고 판단된다. Carbenicillin 및 penicillin-G는 ampicillin과 거의 유사한 결과를 나타내었다. 야생형 균주는 이들 항생물질에 내성을 나

타내었지만 VPA0477 결손균주 및 ampicillin 감수성 균주는 감수성을 나타내었다. 이들 결과는 β-lactam계 항생물질의 종류에 따라 MIC 및 감수성 농도가 다르다는 *Vibrio harveyi*의 연구결과와 유사하다(Teo et al., 2000). 장염비브리오 VPA0477 유전자는 ampicillin을 포함한 일부 β-lactam계 항생물질 중 carbenicillin 및 penicillin-G와는 거의 유사한 MIC 패턴을 나타내었는데 이는 이들 항생제의 기본골격이 거의 유사하기 때문인 것으로 판단된다.

장염비브리오 β-lactamase (VPA0477)의 유전적 특징

염기서열이 결정된 장염비브리오 RIMD2210633 균주의 β-lactamase (VPA0477)는 작은 염색체에 존재하는 유전자로 283 개의 아미노산으로 이루어져 있으며 분자량은 약 31.7 kDa으로 보고되어 있다(Makino et al., 2003). 다른 비브리오속의 β-lactamase 유전자에 관한 연구는 *V. cholerae* (Choury et al., 1999), *V. harveyi* (Teo et al., 2000), *V. fisheri* (Weng et al., 2004)에도 보고되어 있다. 장염비브리오의 VPA0477 유전자와 *V. cholerae*, *V. harveyi* 및 *V. fisheri*의 β-lactamase 유전자와의 상동성은 67%, 75%, 67%로 상당히 높은 편이었다(data not shown). 이들 β-lactamase 유전자의 염색체 DNA에서의 존재위치는 종에 따라 달라 장염비브리오 RIMD2210633, *V. harveyi* ATCC BAA-1116, *Vibrio* sp. *Ex25*는 작은 염색체에

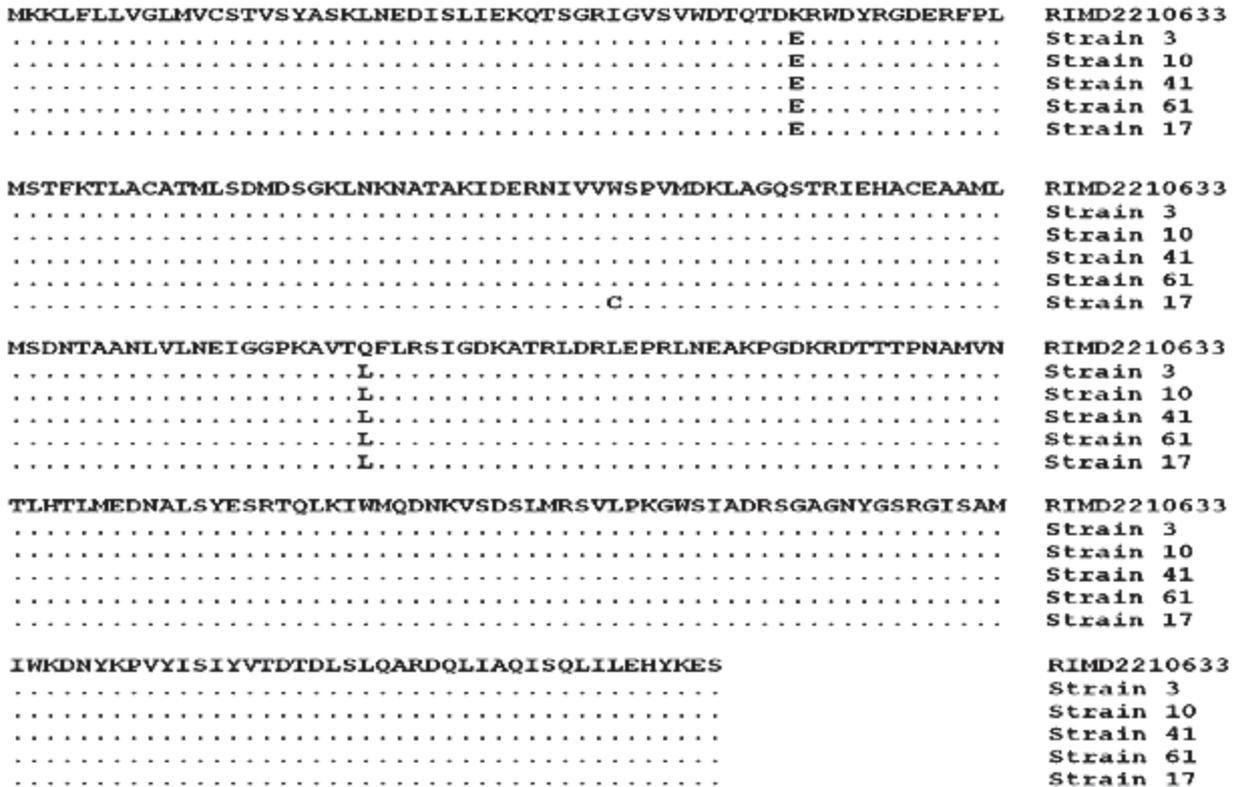


Fig. 2. Nucleotide sequence determination and amino acid sequence alignment of the β-lactamases of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater strains. Amino acid sequence identical to those *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 are indicated with dots.

존재하는 반면, *V. cholerae*, *V. fisheri* ES114, *V. fisheri* MJ11 은 큰 염색체에 존재하고 있다(data not shown). *V. cholerae*의 β-lactamase (VCM661503)는 288개의 아미노산으로 구성되어 있으나 *V. harveyi* (VIBHAR06370), *V. fisheri* (VF1099), *Vibrio* sp. *Ex25* (VEA001392)는 장염비브리오와 동일한 283 개의 아미노산으로 이루어져 있다는 공통점이 있다(Fig. 1). 이들 β-lactamase는 N-말단부터 19개 아미노산은 단백질을 세포 밖으로 분비하는 기능에 관여하는 signal peptide이며, Class A 그룹의 β-lactamase에 속한다. 장염비브리오를 포함한 비브리오속 β-lactamase의 아미노산 서열은 Fig. 1에 비교하였다. Penicillin binding proteins (PBPs)와 serine β-lactamase의 활성 부위에 존재하는 특징적인 아미노산 서열인 STFK는 VPA0477 유전자의 아미노산 서열 62-65 위치에 존재하며, β-lactamase의 SDN loop 서열은 122-124 위치에 존재하고 있다. 또한 Class A β-lactamase의 특징적인 아미노산 서열인 glutamic acid는 163 위치에, RSG 아미노산 서열은 226-228의 위치에 존재하고 있다. 장염비브리오의 VPA0477 유전자는 비브리오속에서 보고된 Class A group β-lactamase의 중요한 구조적 특징 아미노산 서열이 동일한 위치에 존재할 뿐만 아니라 분자량도 매우 유사하다는 특징으로 미루어 Class A group β-lactamase에 속한다고 판단된다.

MIC가 다른 균주의 VPA0477 유전자의 DNA 염기서열 결정

균주에 따라 ampicillin 내성에 대한 MIC가 다른 이유를 밝히기 위하여 MIC가 각각 다른 2,048(strain 3), 1,024(strain 10), 512(strain 41), 128(strain 61) 및 <2 μg/mL (strain 17) 5개 균주를 선별하여 각 균주의 VPA0477 유전자의 DNA 염기서열을 결정한 다음 아미노산으로 치환하여 장염비브리오 RIMD2210633 균주의 VPA0477와 비교하였다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 바와 같이 ampicillin에 대한 MIC가 각각 다른 해수분리 장염비브리오 5개 균주의 VPA0477 유전자는 RIMD2210633 균주의 VPA0477와 동일하게 283개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 감수성 균주를 제외한 4개 균주의 아미노산 서열은 동일하였다. Ampicillin 내성 해수분리 장염비브리오 4개 균주의 48번째 아미노산은 glutamic acid인 반면 RIMD2210633 균주는 lysine이며, 142번째 아미노산은 leucine인 반면 RIMD2210633 균주는 glutamine으로 단지 2개의 아미노산에서 차이가 있었다. 또한 감수성 균주(strain 17)의 경우, 97번째 아미노산이 cysteine인 반면 나머지 균주는 tryptophan이었을 뿐 특별한 차이는 없었다. 따라서 일부 아미노산 차이 때문에 ampicillin에 대한 MIC가 다르다는 점을 설명하기에는 무리가 있다고 판단된다.

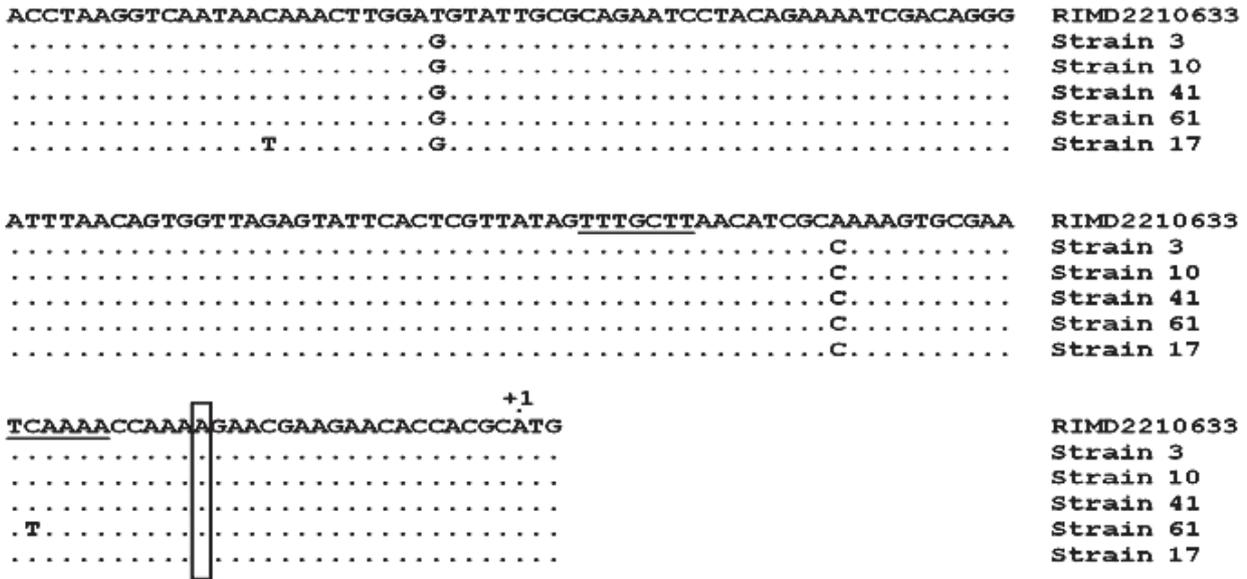


Fig. 3. Nucleotide sequence determination and comparison of the VPA0477 gene promoter region of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater strains. Positions of the putative -35 and -10 sequences are underlined. Deletion nucleotide is boxed. Nucleotides identical to those *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 are indicated with dots.

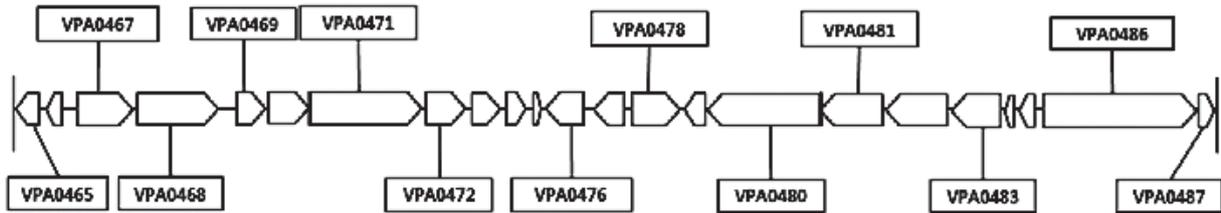


Fig. 4. Genes organization of the region containing the VPA0477 gene in *Vibrio parahaemolyticus* RIMD2210633 strain.

MIC가 다른 균주의 VPA0477 유전자 프로모터 영역 DNA 염기서열의 결정

RIMD2210633 균주 및 해수분리 5개 균주의 VPA0477 유전자 프로모터 영역의 DNA 염기서열을 비교한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 장염비브리오 유전자의 전형적인 promoter motif (-10 and -35 regions)는 존재하나, 전형적인 Shine-Dalgarno 서열은 찾을 수 없었다. 5종의 해수분리 균주 중 2종(strain 61과 strain 17)을 제외한 나머지 3균주의 VPA0477 유전자 프로모터 영역의 염기서열은 동일하였다. RIMD2210633 균주의 VPA0477 유전자는 염기서열이 동일한 3개의 해수분리 균주의 유전자와는 2개의 염기서열 즉 start codon에서 -41번째 및 -125번째의 염기가 달랐다. Strain 61 균주의 경우, start codon에서 -29 위치의 염기는 다른 종의 염기가 C인 반면 T로 단 하나의 염기서열 차이를 보였다. Strain 17 균주는 start codon에서 -19 위치의 nucleotide는 결실되어 존재하지 않았으며, -135 위치의 염기는 T였다. 결론적으로 MIC가 낮거나(strain 61) 또는 감수성 균주(strain 17)에서는 promoter

motif 영역의 염기서열이 다른 균들과 다르거나 또는 start codon에서 -19 위치의 염기가 존재하지 않아 전사를 위한 RNA polymerase가 프로모터에 결합이 불충분하기 때문에 전사과정 이 부분적이거나 또는 거의 불가능하여 ampicillin에 대한 MIC 차이를 보이는 것으로 판단된다. 따라서 이들 균주에 대한 전사 및 발현 차이의 검토는 차후에 필요하다 하겠다.

VPA0477 상·하류영역에 존재하는 유전자의 유무검토

본 실험에 사용한 108개 해수분리 장염비브리오에는 β-lactamase (VPA0477)의 보유성이 밝혀졌다. VPA0477 유전자가 어떤 메커니즘을 통해 장염비브리오에 삽입되었을 때 VPA0477 유전자 단독 또는 다른 유전자와 함께 염색체 DNA에 삽입되었는가 여부는 PCR assay로 검토하였다. 장염비브리오 RIMD2210633 균주의 VPA0477 유전자 상류 및 하류에 존재하는 유전자 배열은 Fig. 4에 나타내었다. 일반적으로 장염비브리오의 경우, 외부 DNA는 transposons 또는 phages에 의해 삽입되었다는 보고가 있다(Makino et al., 2003). 장염비브

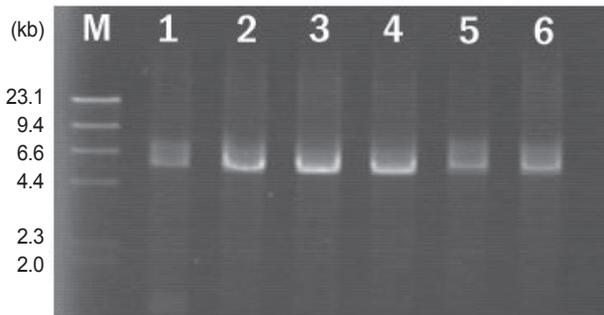


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of DNA products amplified in LA-PCR assay. M, λ /HindIII; lane 1, RIMD2210633; lane 2, strain 3; lane 3, strain 10; lane 4, strain 41; lane 5, strain 61; lane 6, strain 17.

리오 RIMD2210633 균주의 VPA0477 유전자 상류 및 하류에 transposon 또는 phage DNA의 존재유무를 확인하였으나 존재하지 않았다(data not shown). Ampicillin에 대한 MIC가 다른 6개 균주를 사용하여 VPA0477 유전자 상류 및 하류에 존재하는 7개 유전자의 존재유무를 PCR assay로 확인한 결과 실험에 제공된 모든 균주에서 확인하고자 했던 7개 유전자는 증폭되었다(Table 4). 이는 장염비브리오 VPA0477 유전자의 상류 및 하류 영역의 DNA 배열은 거의 유사함을 나타내는 증거라 판단된다. 더 정확한 결과를 위하여 VPA0477 유전자를 포함한 약 5.7 kb 영역을 LA-PCR assay로 증폭하였다. 그 결과 실험에 제공된 6개 균주는 거의 유사한 크기로 증폭되었다(Fig. 5). 이는 증폭된 영역의 DNA는 균주에 상관없이 거의 동일한 구조로 이루어져 있다는 증거이다.

이상의 결과를 종합해 보면, 장염비브리오의 β -lactamase (VPA0477)는 Class A β -lactamase에 속하며, 이 유전자의 상류 및 하류를 포함한 DNA는 과거의 어느 시점에 하나의 큰 단위로써 장염비브리오에 삽입되었을 가능성이 제기되며, 균주에 따라 ampicillin에 대한 MIC가 다른 점은 β -lactamase (VPA0477)의 프로모터 영역의 일부 DNA의 변이 또는 결실의 결과라고 판단된다. 본 실험에 제공된 108개 장염비브리오 모든 균주에서 VPA0477 유전자가 존재하고 있다는 점은 장염비브리오의 분리 및 동정을 위한 표적유전자로 활용 가능성이 높다고 판단된다. 이를 위해서는 분리장소 및 시기가 다른 더 많은 장염비브리오를 대상으로 VPA0477 유전자의 존재유무를 확인하는 실험은 필요하다 하겠다.

사 사

“이 논문은 2011년 군산대학교 수산과학연구소 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음”

참고문헌

Choury D, Aubert G, Szajnert MF, Azibi K, Delpech M and

- Paul G. 1999. Characterization and nucleotide sequence of CARB-6, a new carbenicillin-hydrolyzing β -lactamase from *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother 43, 297-301.
- Highton CE and Hobbs DG. 1971. Penicillin and cell wall synthesis: a study of *Bacillus licheniformis* by electron microscopy. J Bacteriol 106, 646-658.
- Honda T and Iida T. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct haemolysin and related haemolysins. Rev Med Microbiol 4, 106-113.
- Kaneko T and Colwell RR. 1975. Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. Appl Microbiol 29, 269-274.
- Kodama T, Hiyoshi H, Gotoh K, Akeda Y, Matsuda S, Park KS, Cantarelli VV, Iida T and Honda T. 2008. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. Infect Immun 76, 4282-4289.
- Kodama T, Rokuda M, Park KS, Cantarelli VV, Matsuda S, Iida T and Honda T. 2007. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. Cell Microbiol 9, 2598-2609.
- Lambert HP and O'Grady FW. 1992. Antibiotics and chemotherapy. In Veterinary medicine, 6th ed., Churchill Livingstone. New York. U.S.A., 130-139.
- Lee CY, Cheng MF, Yu MS and Pan MJ. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol Lett 19, 31-37.
- Lee H, Oh YH, Park SG and Choi SM. 2007. Antibiotic susceptibility and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the seafood. Kor J Env Hlth 33, 16-20.
- Lee HW, Lim SK and Kim MN. 2009. Characteristics of ampicillin-resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korea peninsula. J Kor Fish Soc 42, 20-25.
- Lee KW and Park KS. 2010. Antibiotic-resistance profiles and the identification of the ampicillin-resistance gene of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seawater. Kor J Fish Aquat Sci 43, 637-641.
- Makino K, Oshima K, Kurokawa K et al., 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. Lancet 361, 743-749.
- Massova I and Mobashery S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. Antimicrob agents Chemother 42, 1-17.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement M100-S12.

- Wayne, PA:19087-19098. U.S.A.
- NVRQS (National Veterinary Research and Quarantine Service). Monitoring of microbial resistance on the food animals and meats. 1-92.
- Oh EG, Yu HS, Shin SB, Son KT, Park KB, Kwon JY, Lee TS and Lee HJ. 2008. Trimethoprim resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the fish farm. J Kor Fish Soc 41, 324-329.
- Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T and Honda T. 2004. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun 72, 6659-6665.
- Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y and Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. Jpn J Med Sci Biol 21, 325-331.
- Son JC, Park SW and Min KJ. 2003. Environmental and antimicrobial characteristics of *Vibrio* spp. isolated from fish, shellfish and brackish water samples in Gyeongbuk eastern coast. Kor J Env Hlth 29, 94-102.
- Son KT, Oh EG, Lee TS, Lee HJ, Kim PH and Kim JH. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from farms on the southern coast of Korea. J Kor Fish Soc 38, 365-371.
- Teo JWP, Suwanto A and Poh CL. 2000. Novel β -lactamase genes from two environmental isolates of *Vibrio harveyi*. Antimicrob Agents Chemother 44, 1309-1314.
- Tomasz A and Waks S. 1975. Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 72, 4162-4166.
- Yu HS, Park KB, Oh EG, Lee TS, Shin SB, Kwon JY, Kim JH and Son KT. 2010. Trimethoprim resistance by class I integron in *Vibrio parahaemolyticus* from a fish farm. Kor J Fish Aquat Sci 43, 125-130.
- Weng SF, Chao YF and Lin JW. 2004. Identification and characteristic analysis of the *ampC* gene encoding β -lactamase from *Vibrio fischeri*. Biochem Biophys Res Commun 314, 838-843.

2011년 9월 28일 접수
 2011년 10월 26일 수정
 2011년 10월 27일 수리